

令和 6 年 6 月 2 6 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16270

研究課題名（和文）改良型プロテオーム解析を用いた、乳癌ホルモン耐性機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of breast cancer hormone resistance mechanisms using improved proteome analysis.

研究代表者

藤岡 大也（Fujioka, Hiroya）

大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50773719

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、乳癌細胞株MCF-7（親株）とパクリタキセル（PTX）を用いて、改良型プロテオーム解析を行った。その結果、親細胞株と比較して、いくつかのタンパク質が同定された。特に、有糸分裂に関与し、病状の進行と関連するStathminタンパク質と、糖代謝関連酵素であるPyruvate kinase M1/M2（PKM1/PKM2）の発現である。Stathminは耐性株で発現が上昇し、PKM1およびPKM2も耐性株で発現上昇が認められた。この結果は、耐性を獲得する際に癌細胞で糖代謝が亢進していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からStathminやPKM1の発現が抗癌剤耐性と関連していることを示すことにより、これらのタンパク質をターゲットとした新規治療薬の開発が期待される。またStathminやPKM1、また特定のmicroRNAの発現変化を診断・予後マーカーとして利用することで、早期の耐性発現を予測し、治療方針を迅速に変更することが可能となる。これにより、患者個々に最適化された治療を提供するための基盤が築かれる。

研究成果の概要（英文）：In this study, an improved proteome analysis was performed using the breast cancer cell line MCF-7 (parental line) and paclitaxel (PTX). As a result, several proteins were identified compared to the parental cell line. In particular, the expression of Stathmin protein, which is involved in mitosis and associated with disease progression, and Pyruvate kinase M1/M2 (PKM1/PKM2), enzymes related to glucose metabolism, were upregulated in the resistant strain, as were PKM1 and PKM2. This result is consistent with the results of the previous study. These results suggest that sugar metabolism is enhanced in cancer cells during the acquisition of resistance.

研究分野：乳腺外科

キーワード：パクリタキセル耐性 乳癌 Stathmin

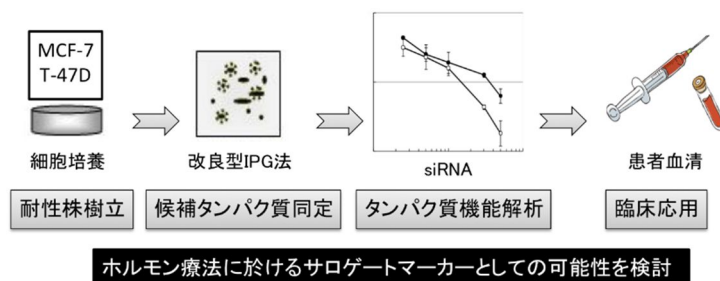
1. 研究開始当初の背景

進行再発乳癌は、ホルモン療法や抗癌剤、放射線療法などの集学的治療を用いても依然として予後が不良である。乳癌の約 8 割はエストロゲンレセプター (ER) 陽性であり、主にエストラジオール (E2) が ER に結合し、E2 依存性に増殖・進展する。進行 ER 陽性乳癌にはホルモン療法が第一選択となるが、耐性が獲得されると化学療法に移行し、有害事象により QOL が低下し治療継続が困難となる。このため進行再発乳癌治療において如何にホルモン療法期間を継続するかが重要であり、ホルモン療法に対する耐性獲得機序を解明し制御するための研究が必要である。

遺伝子の最終産物である蛋白質発現を網羅的に解析するプロテオーム解析が有用と考えられるが、現存のプロテオーム解析手法には二次元電気泳動法による手技的な問題がある。改良型 IPG 法を確立し、パクリタキセル耐性乳癌細胞株に対し解析を行った結果、薬剤耐性に関与する蛋白質の同定に成功した。本研究では、タモキシフェン (TAM) に対する耐性乳癌細胞株を用い、改良型 IPG 法によるプロテオーム解析を行い、ホルモン療法耐性機序の解明を目指す方針とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、乳癌治療におけるホルモン療法耐性の機序を解明することである。具体的には、独自に改良したプロテオーム解析 (改良型 IPG 法) を用いて、TAM 耐性乳癌細胞株に対し耐性因子候補蛋白質を同定し、その機能を解析する。同定した蛋白質を遺伝子導入により操作し、ホルモン療法耐性の獲得機能を明らかにする。また、ホルモン療法施行患者の血清を用いて同定蛋白質の発現を解析し、臨床情報との関連を調査し、乳癌治療の質改善に直結した研究を展開することを目指した (下図)。



3. 研究の方法

研究方法として、以下の計画のもとで研究を開始した。

①タモキシフェン耐性乳癌細胞株の樹立

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 および T47D に TAM を低濃度から徐々に増加させ、長期間曝露し、TAM 耐性乳癌細胞株を樹立しており、これらの細胞を主要な実験に用いる計画であった。

②改良型 IPG 法によるプロテオーム解析

樹立した TAM 耐性株と親株 (非耐性株) を用いて、改良型 IPG 法を駆使したプロテオーム解析を行い、耐性に関与する蛋白質を網羅的に同定する。また、二次元電気泳動法を用いて蛋白質を分離し、質量分析 (MS) で同定する。

③同定蛋白質の機能解析

同定した耐性因子候補蛋白質に対し、siRNA を設計し耐性株に導入する。ウェスタンブロッティング法で標的蛋白質の発現抑制を確認する。MTT アッセイを用いて細胞増殖能の変化を評価し、アポトーシスや細胞周期解析を実施する。

④臨床検体での検証

ホルモン療法施行患者の血清を収集し、ELISA 法で候補蛋白質の発現量を測定する。血清中の候補蛋白質量とホルモン療法の治療効果を比較検討し、臨床の有用性を評価する。

しかしながら、樹立した TAM 耐性細胞株の不安定性や、新型コロナウイルス感染症の影響による各種実験の遅延により、以下の検討を追加する方針とした。

⑤進行再発乳癌の薬剤治療において重要な位置づけである抗癌剤にも着目した。これまでの研究で樹立していた、ヒト乳癌細胞株 MCF7 のパクリタキセル (PTX) 耐性株 MCF7/PTX

を用いて実験を遂行した。

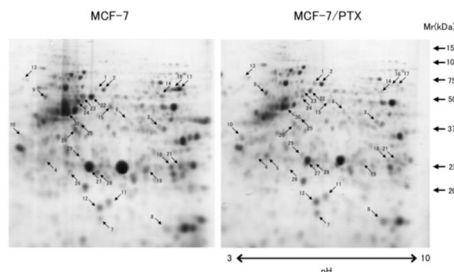
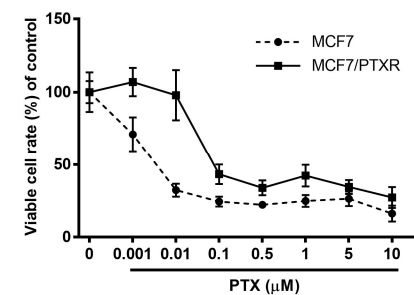
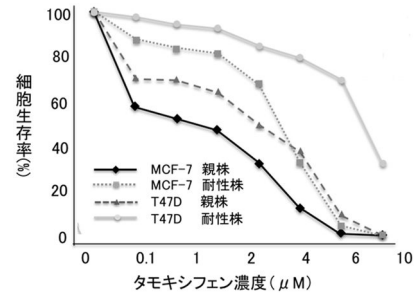
当初より、mRNA とタンパク発現の乖離を懸念しており、最終産物であるプロテオーム解析を実験の主軸に置いていたが、遺伝子の翻訳調節機能をもつ、microRNA にも着目する方針とした。

4. 研究成果

我々の樹立した TAM 耐性乳癌細胞株は、IC₅₀ 値比で MCF-7/TAM : 5 倍、T47D /TAM : 3.5 倍の耐性を有していた (右図)。しかしながら、耐性能にやや不安定性を認めため、中々、本実験に移行することが困難であった。そこで、既に樹立されている TAM ヒト乳癌細胞株 MCF7/TAMR-7 を購入し、実験を進めることにした。

また、乳癌の集学的治療の柱の一つである抗癌剤治療に対する、耐性獲得機序を探索することも、必要であると判断し、これまで利用し、比較的耐性能が安定している、乳癌パクリタキセル耐性株 (MCF7/PTX) を用いて実験を遂行する方針とした。先ず、MCF7/PTX 細胞の耐性能を確認するために、MTT アッセイを実施した。その結果、親株と耐性株の IC₅₀ 値は親株の約 20 倍高かった (右図)。以降の実験に関しては、先ずは、耐性能の安定性を重視し、MCF7/PTX を主に用いて実験を進める方針とした。

改良型 IPG 法で行った二次元電気泳動法を実施する計画であったが、機器の故障などが生じ、当初計画していた実験を円滑に実施することが困難な状況であった。そこで、過去に実施した、MCF7 および MCF7/PTX で同定された、タンパク群に焦点をあてて、実験を進めることとした (下図)。



Oncol Lett. 2017 Jan;13(1):289-295.

Table I. Identification of upregulated proteins in MCF-7/PTX cells compared with MCF-7 cells.

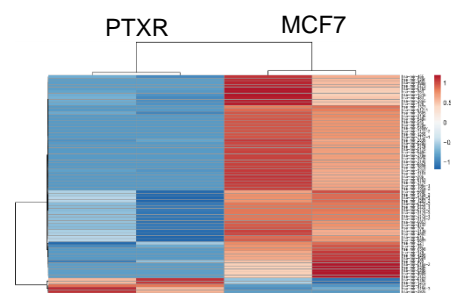
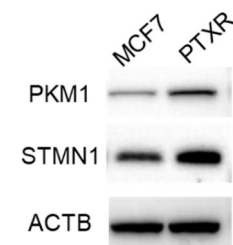
No.	Protein name	Locus name	Mr (Da) ^a	pI ^b	Mascot score ^c	Fold change
1	Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75	73,920	5.87	233	1.9
2	Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75	73,920	5.87	240	1.7
3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	HNRH3	36,960	6.37	172	1.7
4	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C	71,082	5.37	124	2.4
5	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C	71,082	5.37	126	2.5
6	Pyruvate kinase M1/M2	KPYM	58,470	7.96	148	1.9
7	Stathmin	STMN1	17,292	5.76	127	1.5
8	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase A	PPIA	18,229	7.68	124	1.5
9	ATP synthase β -subunit	ATPB	56,525	5.26	216	1.7
10	Tropomyosin α -1 chain	TPM1	32,746	4.69	146	1.8
11	Nucleoside diphosphate kinase A	NDKA	17,309	5.83	122	1.7
12	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC	16,154	5.7	168	1.5
13	78 kD glucose-regulated protein	GRP78	72,402	5.07	161	2.4

^aTheoretical molecular mass (Da) and ^bpI were obtained from the Swiss-Prot database. ^cMascot scores were based on the combined mass and mass/mass spectra from matrix-assisted laser desorption/ionization-TOF/TOF identification. pI, isoelectric point; TOF, time of flight.

中でも、有糸分裂において重要な役割を果たす微小管関連タンパク質で、薬剤耐性との関連が示唆されている Stathmin (Cancer Res : 2002 など) と、糖代謝において重要な役割を果たす酵素であり、特にがん細胞の代謝再プログラム化に参与している PKM (Biochem Biophys Res Commun. 2016 など) に着目した。

質量分析で得られた結果で同定されたタンパク質を確認するためにウェスタンブロット法で Stathmin、PKM1 の発現を確認した (右図)。PKM は、PKM1 と PKM2 のアイソフォームが存在し、がんでは、PKM2 が発現優位になることが示唆されているが、前記の文献では、抗癌剤耐性になると PKM1 の発現が優位になることが示唆されている。我々のプロテオーム解析の結果は、この知見を支持する結果が得られており、今後、その機能の検証を検討している。

また、翻訳調節に関わる microRNA の発現変化に着目し、microRNA のシーケンス解析を実施し、親株と PTX 耐性株で発現が顕著に変化している microRNA 群を同定した (右図)。



現在、同定した microRNA のうち、いくつかの microRNA に焦点を当て、実験を進めている。また、PTX 耐性株で同定した、これ等の事象が、TAM 耐性にどの程度、寄与しているのかを含めて、研究を計画していく予定である。今回は種々のアクシデント（新型コロナウイルスの影響や、機器の故障）にみまわれ、研究期間には十分に実施できなかったが、例えば、細胞間のコミュニケーションにおいて重要な役割を果たし、microRNA を内包するエクソソームなどに着目し、研究を計画することを念頭に置いている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪医科薬科 一般・消化器外科学教室 研究紹介

<https://www.ompu.ac.jp/u-deps/sur/html/laboratory.html>

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------